

小麦不同外植体离体培养与再生研究

刘香利,刘 缙,郭蔼光,赵惠贤

(西北农林科技大学生命科学学院,陕西省农业分子生物学重点实验室,陕西 杨凌 712100)

摘要: 为了研究小麦组织培养的影响因素,对6个小麦品种的幼胚、幼穗以及成熟胚进行组织培养,研究不同基因型、外植体以及培养基对愈伤组织诱导及分化再生的影响。结果表明,不同小麦品种幼胚、幼穗以及成熟胚愈伤组织诱导率均在90%以上,且差异不大,而分化率和再生率却表现出很大差异。总体来说,供试外植体幼胚再生率最高,幼穗次之,成熟胚最低。绵阳19幼胚再生率最高,为54%,其最佳激素培养基为MS+KT 1.0 mg/L+IAA 1.0 mg/L;其次为小偃107和小偃22的幼胚愈伤组织。幼穗愈伤组织中绵阳19愈伤组织再生率最高,为27.5%,其次为洛阳8716。成熟胚愈伤组织培养中陕354再生率最高,为25.1%,优于其幼穗愈伤组织,其次为绵阳19的成熟胚愈伤组织。

关键词: 小麦;幼胚;幼穗;成熟胚;组织培养

中图分类号: S512.1;S336

文献标识码: A

文章编号: 1009-1041(2008)04-0568-05

Study on the Tissue Culture and Plant Regeneration of Different Explant from Wheat

LIU Xiang-li, LIU Jin, GUO Ai-guang, ZHAO Hui-xian

(College of Life Sciences, Northwest A & F University, Key Laboratory of Plant Molecular Biology of Shaanxi Province, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In order to establish a high frequency plant regeneration system, the immature embryo, immature inflorescences and mature embryo of six wheat varieties were cultured to study the effects on the frequency of callus induction and plant regeneration. The result showed that there were little difference between the frequency of callus induced among all varieties and explants, but the frequency of plantlet differentiation and plant regeneration were quite different. Immature embryo was the best explant for regeneration, immature inflorescences took the second place. The frequency of plantlet differentiation and plant regeneration of mature embryo was the lowest. The plant regeneration of Mianyang 19 immature embryo was the highest (54.0%) and its optimal medium was MS+KT 1.0 mg/L+IAA 1.0 mg/L, followed by immature embryo of Xiaoyan 107 and Xiaoyan 22. The highest frequency of plant regeneration for immature inflorescences and mature embryo among all the varieties involved was Mianyang 19 and Shaan 354, respectively.

Key words: Wheat; Immature embryo; Immature inflorescence; Mature embryo; Callus; Differentiation

小麦是世界上最主要的粮食作物之一,应用生物技术对小麦进行品种改良是国内外学者研究的热点之一,建立高效稳定的组织培养体系是小麦遗传转化的基础^[1]。在小麦遗传转化中,幼胚

是应用最早的外植体。许多研究认为,幼胚愈伤组织的诱导和植株再生能力高于幼穗和成熟胚^[2~5],目前获得成功转化的转基因植株大多数来自于幼胚或幼胚愈伤组织^[6~9]。然而,陈梁鸿

收稿日期:2008-01-10

修回日期:2008-04-20

基金项目: 国家转基因研究与产业化开发专项(JY03-A-13-01); 西北农林科技大学青年专项基金项目(0808)。

作者简介: 刘香利(1972—),女,讲师,在读博士,主要从事生化与分子生物学研究。E-mail:liuxiangli@163.com

通讯作者: 郭蔼光(1942—),女,教授,主要从事生化与分子生物学研究。E-mail:guoaigng@yahoo.com.cn

等^[10],林刚、李根英、赵林妹^[11~13]等在比较幼穗和幼胚为受体的转化研究后认为,幼穗的转化效果优于幼胚,幼穗较幼胚更耐继代,更易形成再生植株。虽然小麦幼胚和幼穗再生率相对较高,但其采样受季节限制,而小麦成熟胚的培养不受生长季节和实验条件限制,可常年操作,利用成熟胚进行转化也有一些成功报道^[14~16]。另外,小麦遗传转化中不同外植体愈伤组织的分化能力受基因型的影响很大,致使目前小麦转基因受体材料多限于少数组培性状较好但生产应用前景较差的品种,限制了转基因技术在小麦遗传改良中的广泛使用。

鉴于此,本研究以6个陕西省广泛栽培的小麦品种为材料,对其幼胚、幼穗和成熟胚愈伤组织诱导及植株再生的影响因素进行了研究,旨在探索不同小麦品种、不同外植体愈伤组织诱导及植株再生的有效方法,为利用转基因技术改良小麦提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试小麦品种为郑麦9023、绵阳19、小偃22、洛阳8716、陕354、小偃107,所有材料均播种于西北农林科技大学试验田。

1.2 培养基

诱导培养基:MS基本培养基+500 mg/L 酸水解酪蛋白+2.0 mg/L 2,4-D。

分化培养基:幼胚为MS基本培养基+500 mg/L 酸水解酪蛋白+1.0 mg/L KT+不同浓度 IAA;幼穗为MS基本培养基+500 mg/L 酸水解酪蛋白+1.0 mg/L KT+0.5 mg/L 2,4-D;成熟胚为MS基本培养基+500 mg/L 酸水解酪蛋白+1.5 mg/L KT+0.5 mg/L 2,4-D。

生根培养基:1/2MS基本培养基+500 mg/L 酸水解酪蛋白+0.5 mg/L NAA。

1.3 方 法

1.3.1 幼胚培养 在小麦开花授粉后14~18 d,以幼胚0.5~1.0 mm大小,半透明状为宜。田间取整穗,剥掉内外颖壳,籽粒用70%乙醇和0.1%的升汞消毒后取出幼胚,盾片向上接种于诱导培养基上。暗培养2周后转入光照培养,每2周继代一次,培养28 d后转至分化培养基上进行分化培养。

1.3.2 幼穗培养 幼穗在小麦生长锥处于小穗

分化期(肉眼观察幼穗长度为0.5~1.0 cm左右)取生长一致的植株,剥去主茎外层叶鞘,保留含嫩叶部分在内的幼穗。在超净工作台上用70%乙醇和0.1%的升汞消毒后,小心剥去外围的幼叶,取出幼穗切成2~3 mm的小段接种到诱导培养基上,暗培养2周后进行光照培养,每2周继代一次,继代两次后转至分化培养基上进行分化培养。

1.3.3 成熟胚培养 小麦成熟种子经70%乙醇和0.1%升汞消毒后,在超净台上用无菌水浸种16~20 h,剥取成熟胚,盾片向上接种到诱导培养基上。暗培养2周后,转至光照培养,每2周继代一次,继代两次后转至分化培养基上进行分化。

幼胚、幼穗和成熟胚培养条件均为23℃,光强度3 000 lx,光照时间16 h/d。分化后的小苗转至生根培养基上生根培养。定期统计诱导率,分化率和再生率。

1.3.4 数据统计 出愈率=(出愈外植体数/接种外植体数)×100%;

芽分化率=(分化出芽的愈伤数/接种愈伤数)×100%;

再生率=(再生出完整植株的愈伤数/接种愈伤数)×100%。

2 结果与分析

2.1 不同小麦品种幼胚愈伤组织的诱导与分化

小麦幼胚接种后约3 d左右开始膨大,在盾片周围逐渐形成愈伤组织,7 d后基本全部愈伤化,15 d形成较大的愈伤组织(图1)。在相同诱导培养条件下六个不同小麦品种愈伤组织的诱导率均达到96%以上(表1),且品种间差异不显著。

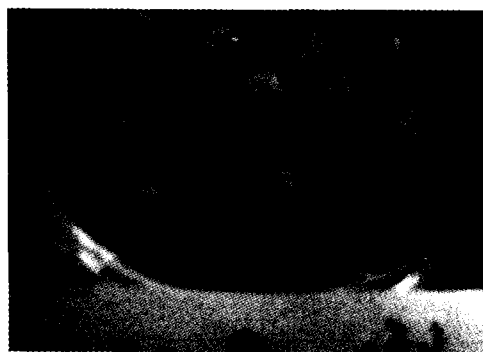


图1 绵阳19的幼胚愈伤组织
Fig.1 The callus induced from Mianyang 19 immature embryo

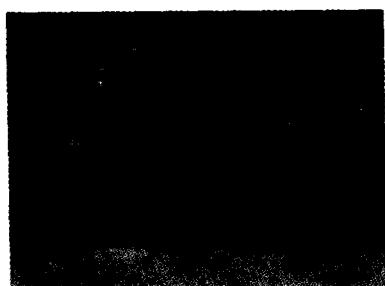


图2 绵阳19的幼胚愈伤组织分化
Fig. 2 The callus differentiation of Mianyang 19 immature embryo

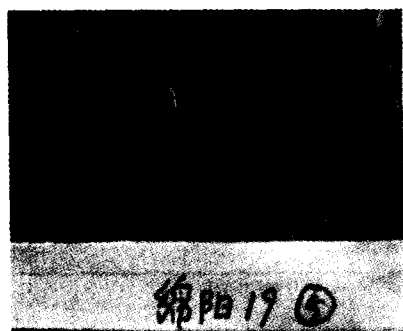


图3 绵阳19的丛生苗
Fig. 3 The tufty plant regenerated from callus of Mianyang 19 immature embryo

转入分化培养以后,愈伤组织逐渐分化产生绿色芽点,进一步分化成小植株(图2)。本试验选用了1.0 mg/L KT和不同浓度IAA的分化培养基(如表2所示)。结果显示,对于绵阳19和洛阳8716来说,目前多数小麦组织培养所采用的1.0 mg/L KT+1.0 mg/L IAA配比比较适宜;而郑麦9023和陕354适宜的IAA浓度为0.5 mg/L;小偃107和小偃22分别为2.0 mg/L和1.5 mg/L。小麦幼胚愈伤组织生根很容易,在分化培养基上分化出小苗,转至生根培养基后就逐渐生成根,形成完整植株,生根率达100%。因此,对于小麦幼胚愈伤组织芽分化率和再生率相同。本研究所选的六个品种在其最适分化条件下的分化再生能力依次为:绵阳19>小偃107>小偃22>郑麦9023>洛阳8716>陕354。其中绵阳19分化率最高(54.0%),且多为丛生苗(图3);陕354最低(32.4%)。因此,本试验中使用幼胚进行转化的最佳品种为绵阳19,最佳分化培养基激素配比为1.0 mg/L KT+1.0 mg/L IAA。其次,小偃107、小偃22和郑麦9023的再生率也均在45%以上,也可用作转化材料。

表1 不同小麦品种幼胚愈伤组织的诱导及再生

Table 1 The frequency of callus formation of different wheat Varieties

品种 Variety	接种胚数 Immature embryo inoculated	出愈胚数 Callus formed	出愈率(%) Frequency of calli formation	再生率(%) Frequency of regenerated plants
小偃107 Xiaoyan 107	259	255	98.5	47.5
小偃22 Xiaoyan 22	260	253	97.3	46.5
陕354 Shaan 354	281	275	97.9	32.4
郑麦9023 Zhengmai 9023	228	220	96.5	45.2
洛阳8716 Luoyang 8716	253	245	96.8	44.5
绵阳19 Mianyang 19	231	223	96.5	54.0

表2 不同分化培养基激素配比对小麦幼胚愈伤组织芽分化率(%)的影响

Table 2 Effects of different IAA concentration on bud differentiation of different wheat Varieties

激素配比 Hormone proportion		小麦品种 Varieties					
KT (mg/L)	IAA (mg/L)	郑麦9023 Zhengmai 9023	绵阳19 Mianyang 19	洛阳8716 Luoyang 8716	小偃107 Xiaoyan 107	小偃22 Xiaoyan 22	陕354 Shaan 354
1.0	0.5	45.2	33.2	40.6	16.0	25.4	32.4
1.0	1.0	43.5	54.0	44.5	23.5	39.8	20.3
1.0	1.5	40.7	42.1	35.1	43.2	46.5	21.5
1.0	2.0	23.2	35.0	33.9	47.5	43.0	17.3

2.2 不同小麦品种幼穗愈伤组织的诱导与分化

幼穗接种后3 d左右开始膨大变形,7~14 d后陆续产生乳白色不规则状突起愈伤组织。继代后转入光照培养,愈伤组织迅速增大转绿。不同

小麦品种幼穗愈伤组织出愈率见表3。由表3可以看出,不同小麦品种幼穗的诱导率都较高,在95.8%~99.0%之间,且差异不明显,出愈率最高的为洛阳8716。进入分化阶段后,各个品种的愈

伤组织的分化特性表现出很大差异。转入分化培养基后,可明显看出小麦幼穗愈伤组织中有一些组织细胞再分化,产生出绿色芽点(图4),而部分愈伤组织生长停止,逐渐褐化。分化后的小苗转入生根培养基后,多数品种愈伤组织能很快诱导生根,而陕354和小偃22的愈伤组织虽生长较快,分化出芽率较高,但生根困难,在生根培养基上迟迟不能诱导生根而褐化死亡,不能再生成苗。由表3可以看出,不同小麦品种幼穗愈伤组织植株再生率的高低次序为:绵阳19>洛阳8716>小偃107>小偃22>郑麦9023>陕354。其中绵阳19的愈伤生长最好,分化率最高;洛阳8716次之。

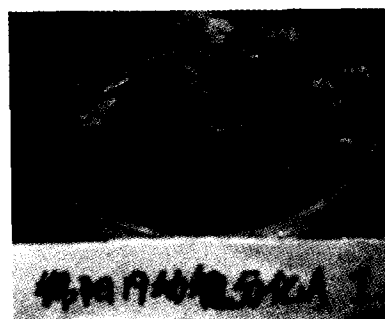


图4 绵阳19的幼穗愈伤组织分化
Fig. 4 The callus differentiation of Mianyang 19 immature inflorescence

表3 不同小麦品种幼穗愈伤组织的诱导、分化和植株再生

Table 3 The frequency of callus formation and plantlet differentiation of different wheat Varieties

品种 Varieties	接种数 Immature inflorescences inoculated	愈伤组织诱导率(%) Frequency of calli formation	愈伤组织分化率(%) Frequency of differentiation	再生植株数 Regenerated plants	再生率(%) Frequency of regenerated plants
郑麦 9023 Zhengmai 9023	297	98.7	21.0	41	13.8
陕 354 Shaan 354	264	98.1	47.0	35	13.3
洛阳 8716 Luoyang 8716	484	99.0	61.2	118	24.4
小偃 22 Xiaoyan 22	649	98.8	46.5	58	8.9
绵阳 19 Mianyang 19	389	95.9	72.9	107	27.5
小偃 107 Xiaoyan 107	400	95.8	53.9	72	18.0

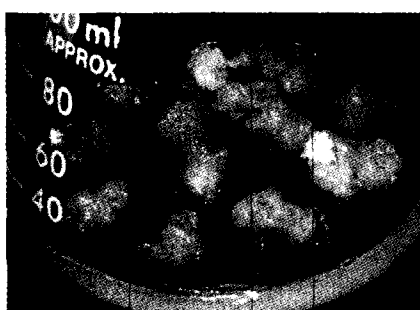


图5 绵阳19的成熟胚愈伤组织分化
Fig. 5 The callus differentiation of Mianyang 19 mature mbryo

2.3 不同小麦品种成熟胚愈伤组织的诱导与分化

成熟胚接种后约5d左右在盾片周围逐渐形成愈伤组织,10d左右全部愈伤化。不同小麦品种成熟胚愈伤组织诱导及植株再生率结果统计见表4。由表4可看出,各品种成熟胚愈伤组织诱导率也均在95%左右,且差异不大,其中小偃22最高,为96.9%。成熟胚愈伤组织初期呈乳白色,表面皱缩,较幼胚愈伤组织结构松散。继代转入光照培养后部分愈伤组织松软呈水浸状,转入分化培养基后不能分化而逐渐褐化;部分成熟胚愈伤组织表面干燥,结构较紧密,转入分化培养基

后正常分化产生芽(图5);另外,在培养中发现,部分成熟胚愈伤组织虽然呈干燥颗粒状,看似有分化潜能,但在分化培养基上只快速增大,形成大量发达的根系,不能分化形成芽,最终不能再生植株(图6)。所选的6个小麦品种中陕354成熟胚再生率最高(25.1%),绵阳19稍差些(23.7%),其次为洛阳8716(15.4%),小偃107、小偃22和郑麦9023再生率均较差。洛阳8716虽然分化初期芽分化率最高,可达42.9%,但后期根大量生成而芽生长缓慢,部分芽逐渐死亡,不能形成正常植株,再生率仅15.4%。小偃107成熟胚培养也



图6 绵阳19成熟胚愈伤组织分化形成的发状根
Fig. 6 The tufty roots differentiated from Mianyang 19 mature embryo callus

存在这一问题。

表4 不同小麦品种成熟胚愈伤组织的分化及植株再生

Table 4 The frequency of plantlet differentiation and of different wheat varieties

种类 Species	接种数 Immature inflorescences inoculated	愈伤组织诱导率(%) Frequency of Calli formation	愈伤组织分化率(%) Frequency of differentiation	再生植株数 Regenerated plants	再生率(%) Frequency of regenerated plants
绵阳 19 Mianyang 19	253	96.8	39.1	60	23.7
洛阳 8716 Luoyang 8716	247	95.5	42.9	38	15.4
陕 354 Shaan 354	243	96.3	38.3	61	25.1
小偃 107 Xiaoyan 107	264	96.6	34.8	23	8.7
小偃 22 Xiaoyan 22	257	96.9	21.4	18	7.0
郑麦 9023 Zhengmai 9023	239	93.3	27.6	13	5.4

3 讨论

本研究通过对六个小麦品种幼穗、幼胚、成熟胚的组织培养发现,六个小麦品种不同外植体愈伤组织诱导率均较高,在90%以上,且不同品种间差异不大;而愈伤组织分化和植株再生率品种间和不同外植体间均存在很大差异。在小麦不同外植体组织培养中发现,愈伤组织的诱导、分化和植株的再生是相互独立的。诱导率高并不表明分化率高,分化率高的品种再生率不一定高。这与Ozge等^[17]在小麦成熟胚培养中的研究结果一致。所选的六个小麦品种,幼胚愈伤组织分化潜力和再生率最高。幼穗愈伤组织分化绿芽十分容易,但分化成完整植株则较为困难,尤其是陕354幼穗愈伤组织,在生根培养基上迟迟不能分化出根。而幼胚愈伤组织只要诱导产生绿芽就可再生成苗。这与尹钧等^[2]、高俊山等^[4]研究结果一致。

在植物组织培养中,细胞分裂素和生长素的相对浓度控制着根和芽分化,小麦幼胚培养中多使用1.0mg/L KT或ZT附加不同浓度的IAA^[9~11]或NAA^[6],如过早分化形成根会抑制芽的分化,这对小麦再生成苗是不利的。本研究结果也表明不同小麦品种幼胚愈伤组织分化所需激素浓度有很大的差异。

成熟胚在诱导过程中部分胚直接萌发,应及时切去胚萌发的小芽,否则会影响愈伤组织生长。为了防止胚直接萌发,通常用成熟胚盾片培养,诱导率会下降,且愈伤组织生长要缓慢些。因此,可在接种时不切去胚,仅用镊子夹伤胚芽后接种即可获得较理想的效果。

参考文献:

- [1] 吉前华,任正隆. 小麦(*Triticum aestivum* L.)品种的组培特性和转基因受体选择[J]. 作物学报, 2004, 30(9): 855—860.
- [2] 尹钧,任江萍,宋丽,等. 小麦不同转基因受体材料的植株再生培养研究[J]. 麦类作物学报, 2004, 24(2): 1—4.
- [3] Carman F G, Jefferson N E, Campbell W F. Induction of

embryogenic *Triticum aestivum* L. calli. I. Quantification of genotype and culture medium effects [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1987, 10: 101—113.

- [4] 高俊山,叶兴国,马传喜,等. 不同组织培养途径对小麦再生能力的研究[J]. 激光生物学报, 2003, 12(6): 406—411.
- [5] 吕晓依,王竹林,奚亚军,等. 小麦遗传转化受体系统建立的研究[J]. 西北植物学报, 2007, 27(5): 859—863.
- [6] 高世庆,徐惠君,程宪国,等. 转大豆 *GmDREB* 基因增强小麦的耐旱及耐盐性[J]. 科学通报, 2005, 50(23): 2617—2625.
- [7] 张彬,丁在松; 张桂芳,等. 根瘤农杆菌介导获得稗草 *Echinochloa crusgalli* 转基因小麦的研究[J]. 作物学报, 2007, 33(3): 356—362.
- [8] Khanna H K, Daggard G E. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of wheat using a superbinary vector and a polyamine-supplemented regeneration medium [J]. Plant Cell Report, 2003, 21: 429—436.
- [9] 付永彩,吴茂森,成卓敏. 小麦不同外植体的农杆菌转化方法研究[J]. 农业生物技术学报, 2002, 10(1): 25—28.
- [10] 陈梁鸿,王新望,张晓东,等. 基因枪转化小麦不同受体的研究[J]. 华北农学报, 1998, 13(1): 1—5.
- [11] 林刚,何勇刚,刘勇,等. 激素对小麦愈伤组织诱导和植株再生的影响[J]. 华中科技大学学报(自然科学版), 2004, 32(9): 111—113.
- [12] 李根英,黄承彦,隋新霞,等. 小麦不同外植体的组织培养效果研究[J]. 麦类作物学报, 2006, 26(1): 21—25.
- [13] 赵林姝,刘录祥,王晶,等. 小麦不同外植体离体培养及转化效率的比较研究[J]. 麦类作物学报, 2006, 26(1): 26—30.
- [14] Mikhail F, Dmitry M, Darya V, et al. The effect of auxins, time exposure to auxin and genotypes on somatic embryogenesis from mature embryos of wheat [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2006, 84: 213—222.
- [15] 丁莉萍,高莹,李圣纯,等. 基因枪介导小麦成熟胚遗传转化的影响因素[J]. 武汉植物学研究, 2007, 25(3): 217—221.
- [16] 徐涛,赵宝存,葛荣朝,等. 利用基因枪法将 *Tag1sk1* 基因导入耐盐小麦成熟胚愈伤组织提高其耐盐性的研究[J]. 生物工程学报, 2006, 22(2): 211—214.
- [17] Ozgen M, Turet M, Altinok S, et al. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes [J]. Plant Cell Report, 1998, 18(3—4): 331—335.